

## SUPEROXIDE ELIMINANT

Patent Number: JP4005237  
Publication date: 1992-01-09  
Inventor(s): ITO MITSUAKI; others: 01  
Applicant(s): NONOGAWA SHOJI KK  
Requested Patent: ☐ JP4005237  
Application Number: JP19900108497 19900424  
Priority Number(s):  
IPC Classification: A61K35/78  
EC Classification:  
Equivalents: JP3156787B2

### Abstract

**PURPOSE:** To provide the title eliminant having high eliminative performance to superoxides having various adverse effects in vivo, also excellent in stability and free from problems in respect of safety, containing, as active ingredient, specific crude drug extract(s) such as from *Eugenia caryophyllata*.

**CONSTITUTION:** The objective superoxide eliminant containing, as active ingredient, at least one crude drug extract selected from *Eugenia caryophyllata*, leaves of *Geranium thunbergii*, *Rhei rhizoma*, *lychrrhizae radix*, rhizome of *coptis japonica*, fruit of *Zizyohus jujuba*, carrot, bark of *Cinnamomum cassia*, flower of *Carthmus tinctorium*, hop, root of *Paeonia moutan*, fruit of *Gardenia jasminoides*, root of *Paeonia albiflora*, *Swertiae herba*, *Gentianae radix*, bark of *Phellodendron amurense*, rhizome of *Cnidium officinale*, rhizome of *Zingiber officinale*, *Aurantii nobilis pericarpium*, *Angelicae radix*, *Platycodi radix*, *Atractylodis lanceae rhizoma*, garlic and seed of *Coix larymajobi*. The present eliminant is incorporated in a cosmetic, medicine, food etc. at such an amount as to be 0.00001 - 10 (pref. 0.01 - 1.0) wt.% on a solid basis.

Data supplied from the esp@cenet database - 12

## ⑫ 公開特許公報(A)

平4-5237

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

A 61 K 35/78

識別記号

D  
E  
F

庁内整理番号

7180-4C  
7180-4C  
7180-4C※

⑭ 公開 平成4年(1992)1月9日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全9頁)

⑮ 発明の名称 スーパーオキシド消去剤

⑯ 特 願 平2-108497

⑰ 出 願 平2(1990)4月24日

⑱ 発 明 者 伊 藤 三 明 岐阜県大垣市浅草4-66 日本メナード化粧品株式会社生化学研究所内

⑲ 発 明 者 広 瀬 統 岐阜県大垣市浅草4-66 日本メナード化粧品株式会社生化学研究所内

⑳ 出 願 人 有限会社野々川商事 愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番24号  
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称  
スーパーオキシド消去剤

2. 特許請求の範囲

チオール、ゲンシショウコ、ダイオウ、カンゾウ、オウレン、タイソウ、ニンジン、ケイヒ、ペニシナ、カッブ、ボタンビ、サンザシ、ジャクマク、センブリ、カミツレ、ゲンチアナ、オウバク、セシキユウ、ショウキョウ、チンピ、トウモロコシ、ソウジュツ、ニンニク、ヨクイニンより選ばれる一種または二種以上の生薬エキスを有効成分とするスーパーオキシド消去剤。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、生薬エキスを有効成分とするスーパーオキシド消去剤に関し、化粧品、医薬品、食品等に利用することができる。

(従来の技術)

スーパーオキシド(〇<sub>2</sub>)は、活性酸素の一種で生体内において種々な障害を与えることが知られ

ている。例えば、脂質の過酸化、DNAの損傷や細胞膜による障害、炎症、発がんの要因、白内障、動脈硬化などの原因になっていることがわかってきた。これらの障害を防ぐためには、〇<sub>2</sub>を消去することが大切になってくる。

スーパーオキシド消去剤としては、SOD(スーパーオキシドディスムターゼ)が知られている。(発明が解決しようとする課題)

しかし、SODは高価な酵素であり、また、水溶液中ではかなり安定であるが、有機溶媒が含まれる系では安定性に欠けている。また、さらに、皮膚に対する感受性の点でも問題が懸念されている。

そこで、今回、〇<sub>2</sub>消去作用を有するものを発見したところ、生薬エキスを原料とした〇<sub>2</sub>消去作用があることがわかり、さらに、その生薬エキスが安定性に優れ、また、安全性も問題ないことがわかり本発明を完成した。

(課題を解決するための手段)

本発明でいう生薬、チオール、ダイオウ、ケイヒ、ゲンシショウコ、ペニシナ、カッブ、ボタン

ビ、カンゾウ、サンザシ、シャクヤク、センプリ、カミツレ、マンチアサ、オウバク、センキョウ、ショウキョウ、ナンビ、トウキ、ネキョウ、ニンジン、ソウジユツ、オウレン、ヨクイニン、タイリクは汎用化粧品原料集（日本化粧品工業連合会、東京日報社）あるいは日本薬局方解説書（日本公定書協会、東京書店）に天然植物あるいは生薬として記載があり、その記載のある植物あるいは生薬を購入して使用することができる。

生薬エキ스는その植物あるいは生薬に風水性溶媒（例えば、水、エタノール、メタノール、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール等）を単独あるいは混合液で加え、室温であるいは加熱して常法により抽出することができる。抽出時に、必要に応じて、アセトンで脱脂してもよい。また、生薬エキ스는抽出液（液エキス）の状態でよいし、濃縮あるいは乾燥して乾エキスあるいは乾燥エキスの状態で用いてもよい。抽出方法は、汎用化粧品原料集および日本薬局方解説書に記載されている製造方法を参考にすることができる。

生薬には、日本薬局方に記載されるショウリウ、ダイオウ、ケイヒ、ゲンノショウコ、ペニタ、イタンビ、カンゾウ、シャクヤク、センプリ、マンチアサ、オウバク、センキョウ、ショウキョウ、ナンビ、トウキ、ネキョウ、ニンジン、ソウジユツ、オウレン、ヨクイニン、タイリクを使用した。

それぞれの生薬10gに開製水1gを加え、100℃で、2時間抽出した後に、残渣を50μmのメッシュで除去した。このようにして得られた抽出液40～50mlをそれぞれの生薬エキスとした。

#### 実施例2 O<sub>2</sub>除去剤

実施例1で示したそれぞれの生薬10gに1gの開製水を加え、60℃で2時間抽出した後に残渣を50μmのメッシュで取り除いた。このようにして得られた抽出液をそれぞれ凍結乾燥し、生薬エキス5～6gを得た。

#### 実施例3 O<sub>2</sub>除去剤

生薬には、日本薬局方に記載されるショウリウ、ダイオウ、ケイヒ、マンチアサ、オウバク、ペニタ

本発明のO<sub>2</sub>除去剤は生薬エキスをそのまま用いてもよいし、また、必要に応じて本発明の効果を損なわない範囲内で化粧品、医薬品、食品等に用いられる各種成分を添加することができる。その成分としては、油脂類、ロウ類、炭化水素類、脂肪酸類、アルコール類、合成エステル類、界面活性剤、保湿剤、無機類、香料、顔料、水等が挙げられる。剤形は特に選ばない。

本発明の実施に当たって、O<sub>2</sub>除去剤の配合量は化粧品、医薬品、食品等の全量中、生薬エキス（固形物）として0.00001～10重量%、好ましくは、0.01～1.0重量%である。0.00001重量%より低濃度になると効果に乏しくなり、また、10重量%を超えると不経済である。一日当りの服用量は性別年齢によって異なるが上記固形物として、約1～1000mgである。以下に、実施例によって本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

#### (実施例)

##### 実施例1 O<sub>2</sub>除去剤

ボタンビ、カンゾウ、シャクヤク、センプリ、マンチアサ、オウバク、センキョウ、ショウキョウ、ナンビ、トウキ、ネキョウ、ニンジン、ソウジユツ、オウレン、ヨクイニン、タイリクを使用した。

それぞれの生薬10gに30% (w/v) エタノール100mlを加え、60℃で2時間連続抽出した後に残渣を50μmのメッシュを通して除き、それぞれの生薬エキス80～90mlを得た。

##### 実施例4 O<sub>2</sub>除去剤

実施例3に示した生薬10gにそれぞれ30% (w/v) エタノール100mlを加え、60℃で2時間連続抽出した後に、残渣を50μmのメッシュで除いた。得られた抽出液をそれぞれ凍結乾燥して生薬エキス1～2gを得た。

##### 実施例5 O<sub>2</sub>除去剤

アルプス薬品工業株式会社より購入したエキス剤（表-1）を開製水に溶かし、不溶物は50μmのメッシュで取り除いた。この溶液に1,3-ブチレングリコール（純度20% (w/v)）およびα-トコシ安島香酸メチルエステル（純度99.1% (w/v)）

を加工し、生薬エキスの濃度は固形物として0.1% (w/w) になるように調整した。

表-1 生薬エキスの一覧表

生薬名	温度	抽出溶媒	エキスの剤形
アケビ	100	水	乾燥エキス
アケビ		30%EtOH	液エキス
アケビ		70%EtOH	チンキ
アケビ		水	乾燥エキス
アケビ		高EtOH	乾燥エキス
アケビ	100	水	乾燥エキス
アケビ	100	水	乾燥エキス
アケビ/アケビ		水	エキス末
アケビ		30%EtOH	液エキス
アケビ	高温	水	軟エキス
アケビ	100	水	乾燥エキス
アケビ	100	水	乾燥エキス
アケビ		水	軟エキス
アケビ	100	EtOH:1-10	液エキス

(表-1の続き)

アケビ		水	乾燥エキス
アケビ		30%EtOH	軟エキス
アケビ	100	水	乾燥エキス
アケビ	100	水	乾燥エキス
アケビ	100	水	乾燥エキス
アケビ	高温	水	乾燥エキス
アケビ		水	軟エキス
アケビ/アケビ		30%EtOH	液エキス
アケビ	95	水	乾燥エキス
アケビ		30%EtOH	軟エキス
アケビ	100	水	乾燥エキス
アケビ		水	乾燥エキス

上記表において、温度は抽出温度(°C)を表している。記載のないものは、「日局」製剤規格にエキス剤の製法を準用したものである。

(本発明の効果)

本発明のO<sub>2</sub>消去剤は優れたO<sub>2</sub>消去能を有し、また、安定性にも優れている。さらに、安全性に

ついても問題なかった。

以下に、実験例によって、さらに詳しく本発明の効果の説明する。

#### 実験例1

表-1に示した生薬エキスをを用い、PontiらのNB法(Chem.-Biol. Interactions, 23: 281-291, 1978)でO<sub>2</sub>消去作用を測定した。すなわち、5.2 μM PMS (phenazine methosulphate) と73 μM NADHによって発生するO<sub>2</sub>と80 μM NB (nitro blue tetrazolium) の反応によって生じるホルマゼンを580nmの吸光度で測定するものである。

試料無添加と試料添加の場合のホルマゼン生成速度を測定し、下記の式によりO<sub>2</sub>消去率を計算した。

$$O_2 \text{ 消去率 (\%)} = \left( 1 - \frac{B}{A} \right) \times 100$$

A 試料無添加時のホルマゼン生成初速度

B 試料添加時のホルマゼン生成初速度

表-2にその結果を示した。

表-2 生薬エキスのO<sub>2</sub>消去作用

生薬名	エキス濃度 (μg/ml)	O <sub>2</sub> 消去率 (%)
アケビ	5.0	33.8
	10.0	53.0
	30.0	63.0
	100.0	73.6
アケビ/アケビ	30.0	53.4
	100.0	64.3
アケビ	10.0	34.5
	15.0	50.7
	30.0	60.6
	5.0	2.5
アケビ	10.0	25.5
	50.0	81.7
	25.0	45.1
	50.0	65.0
アケビ	100.0	75.4

(表-2の続き)

生薬名	エキス濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	OH-消去率 (%)
アサリ	100.0	27.5
	200.0	47.3
	300.0	59.3
アサリと	25.0	8.9
	50.0	45.4
	100.0	73.8
ササリ	50.0	18.3
	100.0	49.0
	200.0	74.1
ササリと	98.0	29.8
	196.0	45.4
	294.0	55.7
アサリと	10.0	14.5
	30.0	20.9
	100.0	45.1
ササリと	10.0	35.7
	30.0	46.8

(表-2の続き)

生薬名	エキス濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	OH-消去率 (%)
アサリと	100.0	65.7
	10.0	42.0
	30.0	58.0
アサリと	100.0	65.0
	30.0	21.1
	50.0	45.5
アサリと	100.0	65.6
	10.0	27.7
	100.0	56.7
アサリと	10.0	21.4
	100.0	56.1
アサリと	10.0	25.8
	100.0	55.9
アサリと	10.0	28.1
	100.0	44.6
アサリと	10.0	7.0
	100.0	33.9

(表-2の続き)

生薬名	エキス濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	OH-消去率 (%)
アサリ	10.0	15.9
	100.0	31.7
	10.0	4.3
アサリと	100.0	30.1
	10.0	23.8
	100.0	29.8
アサリと	10.0	7.8
	100.0	29.8
アサリと	10.0	0
	100.0	24.5
アサリと	10.0	1.5
	100.0	23.5
アサリと	10.0	0
	100.0	12.4
アサリと	100.0	0
	10.0	12.9
アサリと	10.0	12.9
	10.0	12.9
	10.0	12.9

(表-2の続き)

500	0.2	16.2
	0.5	45.2
	1.0	74.2

500: ウシ赤血球由来500

#### 実験例2

実験例1と同じ生薬エキスを用い、大南らの亜硝酸法(活性酸素、監修 八木麗夫、中野悦、編集 二本坂雄、島崎弘幸、医歯薬出版株式会社)でOH-消去作用を測定した。

すなわち、0.1mM キサンチンと0.00344g/l(0.01mM) キサンチンオキシダーゼ(XOD)の系でOH-を生じさせ、そのOH-とヒドロキシルアミンの反応によって生じる亜硝酸を発色剤で発色させた後に550nmの吸光度を測定する方法である。

試料無添加の場合と試料添加の場合の吸光度から以下の計算式でOH-消去率を求めた。

$$\text{OH-消去率}(\%) = \left(1 - \frac{B}{A}\right) \times 100$$

A 試料無添加時の550nmの吸光度増加量

(表-3の続き)

B 試料無添加時の550nmの吸光度増加量

生薬名 エキス濃度

〇/消去率

表-3にその結果を示した。

(μg/ml)

(%)

表-3 生薬エキスの〇/消去作用

生薬名	エキスの濃度 (μg/ml)	〇/消去率 (%)
オウゴン	10.0	12.4
	30.0	21.8
	100.0	47.4
	300.0	52.4
オウゴン	10.0	14.9
	30.0	33.0
	100.0	48.5
	300.0	72.7
オウゴン	10.0	9.8
	30.0	13.9
	100.0	35.1
	300.0	63.4
オウゴン	30.0	8.0

オウゴン	100.0	15.5
	300.0	48.0
	1000.0	75.1
	10.0	13.5
オウゴン	30.0	34.7
	100.0	53.1
	300.0	85.7
	100.0	0
オウゴン	300.0	0
	1000.0	43.2
	3000.0	59.8
	30.0	9.3
オウゴン	100.0	19.5
	300.0	40.0
	1000.0	72.0
	30.0	0
オウゴン	100.0	17.3

(表-3の続き)

生薬名	エキスの濃度 (μg/ml)	〇/消去率 (%)
オウゴン	300.0	39.1
	1000.0	71.5
オウゴン	30.0	1.4
	100.0	22.8
	300.0	30.3
	1000.0	58.6
オウゴン	30.0	10.3
	100.0	23.4
	300.0	33.8
	1000.0	9.0
オウゴン	30.0	13.1
	100.0	31.7
	300.0	52.8
	1000.0	33.8
オウゴン	1000.0	56.8
	3000.0	79.6

(表-3の続き)

生薬名	エキスの濃度 (μg/ml)	〇/消去率 (%)
オウゴン	200.0	0
	400.0	23.1
	800.0	50.3
	1000.0	72.4
オウゴン	200.0	43.5
	400.0	50.8
	800.0	67.2
	30.0	0
オウゴン	100.0	15.5
	300.0	58.7
	1000.0	73.4
	100.0	3.4
オウゴン	200.0	5.4
	400.0	0.3
	100.0	2.8
	200.0	2.6
オウゴン	100.0	2.2

(表-3の続き)

生薬名	エキス濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\text{O}_2$ 除去率 (%)
クワシヤ	100.0	1.7
コノナ	330.0	0.3
コノナ	100.0	0
クワシヤ	100.0	1.1
クワシヤ	100.0	0
.....		
SOD	0.1	27.5
	0.25	45.8
	0.5	58.0

SOD: クワシヤ球田来SOD

## 実験例3

実験例1、2と同じ生薬エキスをを用いた。

$\text{O}_2$ の測定は吉川らのスピントラップ法(E.S.R.とフリーラジカル、編集:西川弘毅、吉川敬一、日本薬学雑誌、1、E.S.R.とフリーラジカルーその臨床応用の可能性、p.13-18)を用いた。トラップ剤としてはD.M.P.O. (5,5-dimethyl-1-pyrrrole)

na-H-oxide)を使用した。

すなわち、2 mM キサンチンと0.063unit/ml キサンチンオキシダーゼの系によって $\text{O}_2$ を発生させ、D.M.P.O.- $\text{O}_2$ スピニアダクトをE.S.R. (electron spin resonance)で検出した。図-1に、そのシグナルピークを示した。このピークのシグナル強度( $I_{\text{O}_2}$ )をMnOのシグナル強度( $I_{\text{MnO}}$ )と比較することによって $\text{O}_2$ を定量した。

図-2、図-3に示したように、SODあるいは生薬エキスをその系に加えると $\text{O}_2$ のシグナル強度が小さくなり、 $\text{O}_2$ が除去された。

 $\text{O}_2$ の除去率は次の計算式で求めた。

$$\text{O}_2\text{除去率}(\%) = \left(1 - \frac{B}{A}\right) \times 100$$

A: 試料無添加時の $I_{\text{O}_2}$ を試料無添加時の $I_{\text{MnO}}$ で割った値

B: 試料添加時の $I_{\text{O}_2}$ を試料添加時の $I_{\text{MnO}}$ で割った値

E.S.R. (JOSHI-JES-1121、日本電子社)の測定系

内はmagnetic field:  $340.0 \pm 5.0\text{G}$ , microwave power: 10.0mW, modulation amplitude: 0.1mT, sweep time: 10mT/min, response time: 0.15sec, receiver gain:  $\times 1000$ とした。

表-4にその結果を示した。

表-4 生薬エキスの $\text{O}_2$ 除去作用

生薬名	エキス濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\text{O}_2$ 除去率 (%)
クワシヤ	1.0	14.8
	5.0	47.2
	10.0	67.8
	20.0	81.0
	100.0	100.0
クワシヤ	1.0	21.3
	5.0	38.6
	10.0	52.5
	20.0	78.4
	100.0	100.0
クワシヤ	1.0	11.4
	5.0	40.2

(表-4の続き)

生薬名	エキス濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\text{O}_2$ 除去率 (%)
クワシヤ	10.0	58.7
	20.0	74.7
	100.0	100.0
クワシヤ	10.0	28.2
	20.0	74.7
	100.0	90.2
クワシヤ	10.0	32.7
	100.0	78.2
クワシヤ	10.0	18.6
	100.0	74.1
クワシヤ	10.0	23.8
	100.0	58.4
クワシヤ	10.0	0
	100.0	57.0
クワシヤ	100.0	38.3
クワシヤ	10.0	12.8
	100.0	50.4

(表-4の続き)

生薬名	エキスの濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	O <sub>2</sub> 消去率 (%)
ショウジョ	100.0	51.0
ショウジョ	100.0	45.3
ショウジョ	100.0	40.3
ショウジョ	100.0	38.2
ショウジョ	100.0	37.1
ショウジョ	100.0	30.2
ショウジョ	100.0	29.8
ショウジョ	100.0	25.0
ショウジョ	100.0	23.4
ショウジョ	100.0	21.3
ショウジョ	100.0	15.5
ショウジョ	100.0	11.9
ショウジョ	100.0	7.7
ショウジョ	100.0	0
.....		
SOD	0.1	34.7
	0.2	48.6

由来SODを1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の水溶液で、120℃、15minの処理をしたところ、SODがほとんど失活したのに対し、実施例1～5のO<sub>2</sub>消去剤はまったくO<sub>2</sub>消去能が変化しなかった。

#### 実験例6

実施例1～5のO<sub>2</sub>消去剤について、一次刺激性試験および感作性試験を行った。

その結果、一次刺激性および感作性は問題なかった。

以上示したように、本発明の生薬エキスを有効成分とするO<sub>2</sub>消去剤は、優れたO<sub>2</sub>消去能を有する。さらに、本発明のO<sub>2</sub>消去剤は非常に安定性に優れ、また、安全性についても問題はなかった。

#### 4. 効果的な説明

図-1は、ESR法における・DMPO-オキシビシムダクトのシグナルピークを示している。I<sub>O<sub>2</sub></sub>はO<sub>2</sub>のシグナル強度、そして、I<sub>MnO</sub>はMnOのシグナル強度である。

図-2は、ESR法における・DMPO-オキシビシムダクトのシグナル強度がSODによって小さくなる

(表-4の続き)

SOD	1.0	72.2
SOD: ワシ赤血球由来SOD		

以上、本発明で用いる生薬エキスは三種類の方法全てにおいてO<sub>2</sub>消去作用を示した。特に、その作用において、NBT法とESR法は高い相関を示し( $p < 0.001$ )、ESR法と亜硝酸法においても相関を示した( $p < 0.05$ )。一部の生薬エキス、例えば、ショウジョ(エキスの濃度100.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )はXODに対して強い阻害作用を示したが、10.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ においては阻害作用を示さなくなった。XOD由来のO<sub>2</sub>による障害、例えば、関節炎などに対して、この品種はより有効である。

#### 実験例4

実施例1～5のO<sub>2</sub>消去剤についても、同様にNBT法、亜硝酸法、ESR法でO<sub>2</sub>消去作用を測定したところ、バクモンドウ以外は全てO<sub>2</sub>消去能を有していた。

#### 実験例5

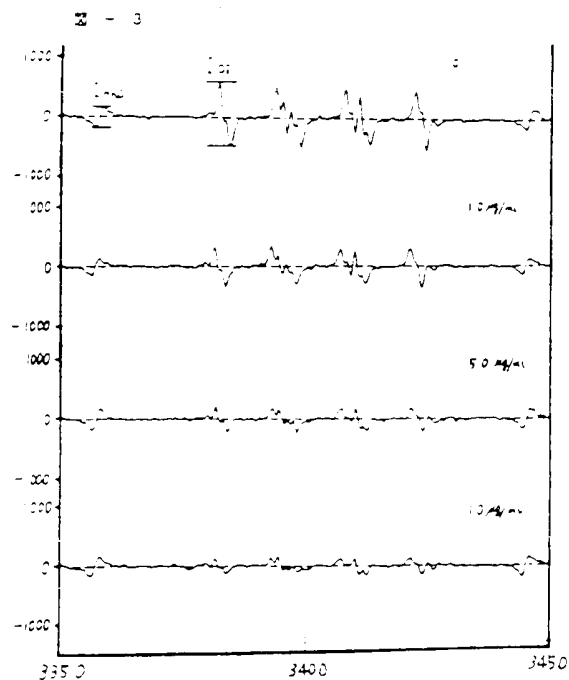
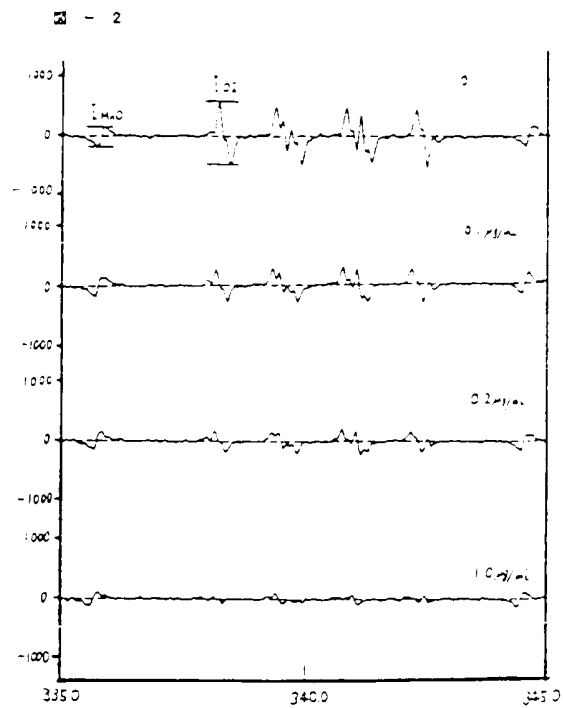
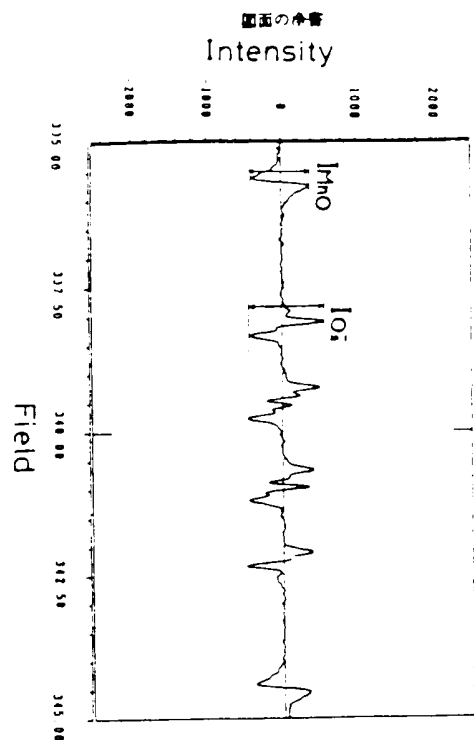
実施例1～5のO<sub>2</sub>消去剤、そして、ワシ赤血球

種子を示している。

図-3は、ESR法における・DMPO-オキシビシムダクトのシグナル強度がショウジョエキスによって小さくなる種子を示している。

図-2、図-3において、縦軸はシグナル強度(Intensity)を、横軸はmagnetic field(Field)の範囲を示している。また、濃度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )はそれぞれ、SODおよびショウジョエキスの濃度を示している。





神 戸 出 願 人 野 々 田 研 究 所

第1頁の続き

⑤Int. Cl.<sup>3</sup>

A 61 K 35/78

識別記号

庁内整理番号

J	7180-4C
K	7180-4C
M	7180-4C
N	7180-4C
T	7180-4C
U	7180-4C
V	7180-4C
C	7180-4C
	6977-4B
K	9051-4C

// A 23 L 1/015  
A 61 K 7/00

## 手続補正書(方式)

平成2年8月17日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示 平成2年特許願第108497号

2. 発明の名称 スーパーオキシド消去剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 名古屋市中区丸の内3丁目5番24号

名称 有限会社 野々川 隆 幸

代表者 野々川 隆 幸



4. 補正命令の日付

平成2年7月31日

5. 補正の対象

「図面」

6. 補正の内容

図-1を別紙のとおり補正する。

特許庁  
2820